



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 A23L 1/22, C07K 3/02, 15/14	A1	(11) 国際公開番号 WO 93/10676 (43) 国際公開日 1993年6月10日 (10.06.1993)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/01584 (22) 国際出願日 1992年12月3日(03. 12. 92) (30) 優先権データ 特願平3/347734 1991年12月4日(04. 12. 91) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 三菱石油株式会社(MITSUBISHI OIL CO., LTD.)[JP/JP] 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目2番4号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 上村直久(KAMIMURA, Naohisa)[JP/JP] 〒114 東京都北区十条仲原二丁目16番8号 光ハイッ103 Tokyo, (JP) 牧野知之(MAKINO, Tomoyuki)[JP/JP] 〒230 神奈川県横浜市鶴見区北寺尾6-6-B-602 Kanagawa, (JP) 平野明子(HIRANO, Akiko)[JP/JP] 〒561 大阪府豊中市曽根東町二丁目10番4号-451 Osaka, (JP) 栗原良枝(KURIHARA, Yoshie)[JP/JP] 〒158 東京都世田谷区奥沢七丁目4番7号 Tokyo, (JP) (74) 代理人 弁理士 萩野 平, 外(HAGINO, Taira et al.) 〒100 東京都千代田区霞が関3丁目8番1号 虎の門三井ビル14階 栄光特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AT(欧州特許), BE(欧州特許), CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IE(欧州特許), IT(欧州特許), KR, LU(欧州特許), MC(欧州特許), NL(欧州特許), PT(欧州特許), SE(欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING SWEETNESS INDUCER MIRACULIN (54) 発明の名称 甘味誘導物質ミラクリンの製造方法 (57) Abstract A process for producing a sweetness inducer miraculin by extracting from a miraculin-containing raw material with the use of an aqueous acidic buffer solution, which enables even such a pure miraculin as to have a stabilized sweetness inducer activity and being free from colored impurities to be efficiently produced on an industrial scale.		

(57) 要約

ミラクリン含有原料から酸性緩衝塩水溶液によって抽出するミラクリンの製造方法により、甘味誘導活性が安定し、着色不純物のない精製されたミラクリンも効率的に工業生産することができる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MW	マラウイ
AU	オーストラリア	GA	ガボン	NL	オランダ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NO	ノルウェー
BE	ベルギー	GN	ギニア	NZ	ニュージーランド
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	PL	ポーランド
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	PT	ポルトガル
BJ	ベナン	IE	アイルランド	RO	ルーマニア
BR	ブラジル	IT	イタリア	RU	ロシア連邦
CA	カナダ	JP	日本	SD	スーダン
CF	中央アフリカ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CG	コンゴ	KR	大韓民国	SK	スロヴァキア共和国
CH	スイス	KZ	カザフスタン	SN	セネガル
CI	コート・ジボアール	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソヴィエト連邦
CM	カメルーン	LK	スリランカ	TD	チャード
CS	チェッコスロヴァキア	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
CZ	チェッコ共和国	MC	モナコ	UA	ウクライナ
DE	ドイツ	MG	マダガスカル	US	米国
DK	デンマーク	ML	マリ	VN	ヴェトナム
FI	フィンランド	MN	モンゴル		
ES	スペイン	MR	モーリタニア		

明 細 書

甘味誘導物質ミラクリンの製造方法

技術分野

本発明は、ミラクリンを含有する原料から甘味誘導物質、ミラク
5 リン(miraculin)を効率的かつ安定的に製造する方法に関する。

背景技術

西アフリカ原産の植物(Richadella dulcifica)、通称ミラクル
フルーツには、これを食した直後に酸味のものを味わうと甘く感じ
10 るという独特の性質を持っている。そして、この作用は甘味誘導物
質ミラクリンによることが知られている。

その甘味誘導作用の詳細な機構は現在のところ明らかではないが、
ミラクリンそのものとしては精製され、既に、純品が得られており、
分子量40,000前後の糖タンパク質としてアミノ酸配列も明らかにな
15 っている(特開平3-218400号公報)。

この甘味誘導物質ミラクリンの製造方法として、これまで次のよ
うな方法が提案されている。

(1) K. Kurihara, L. M. Beidler ; Science, 161, 1241 (1968)
によれば、凍結乾燥したミラクルフルーツの果肉をpH 10.5の
20 炭酸塩緩衝液中でホモジナイズし活性部分を抽出する。更に、Y.
Kurihara. S. Terasaki ; Biochem. Biophys. Acta, 719, 444
(1982)によれば、同様の抽出処理で得られた抽出液に硫酸アンモニ
ウムを加えて塩析して、沈澱物をリン酸緩衝液に溶解し、透析に
より硫酸アンモニウムを除去する。さらに得られた溶液を等電点
25 電気泳動等で精製した後ミラクリンを得る。

(2) 又、特開昭62-242700号公報によれば、ミラクルフルーツの
果肉から抽出溶媒として、pH 6~9付近の中性塩溶液を用いてミ

ラクリンを抽出する。

(3) そして、特開昭63-185349号公報によれば、ミラクルフルーツの果肉を粉碎し、水を添加後ホモジナイズし洗浄液が着色しなくなるまで水洗いする。洗浄後の果肉に中性の塩化ナトリウム水溶液を加えミラクリンを抽出する。次に、この抽出液を硫酸アンモニウムで塩析し、ミラクリン画分の沈殿物を得る。この沈殿物を中性のリン酸緩衝液に溶解し、CMセファロースイオン交換クロマトグラフィーにかけ、さらにアフィニティークロマトグラフィーにかけて精製する、方法である。

10 しかしながら、上記(1)及び(2)から得られる抽出液は不純物を有するため濃い着色を示し、色相的に好ましくなく、しかも、この着色物質の除去は硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動等の生化学的な様々の分離方法を利用しても困難であった。

15 又、さらに着色原因となる不純物がミラクリンに強く結合していると考えられるため、その活性の一部が失われ、高純度のミラクリンが得られないばかりか、甘味誘導活性の低下が認められるという重大な問題があった。

20 そこで、(3)の製造方法においては、着色物質を除去する手段として、ミラクルフルーツの果肉を洗液が着色しなくなるまで水洗している。しかし、この方法で甘味誘導活性の高いミラクリンの抽出を行なうためには、抽出前処理として水洗浄を洗液が着色しなくなるまで繰り返し行わねばならず、洗浄、分離のために相当の時間と労力が必要になり、しかもミラクルフルーツ果肉中に含まれるミラク
25 リンの安定性が低いため、長時間の抽出前処理を行なうことは何等かの悪影響を及ぼす恐れも考えられる。

更にミラクリン含有液は、pH 2 以下もしくはpH 11 以上にな

るとミラクリン成分の活性が失活し易い性質があり、過度の酸性やアルカリ性での抽出は好ましくはない。又、(3)の方法における水洗浄前処理をせずに抽出を行なうと、不純物質中の種々酸性物質により抽出液のpHが過度に低下し、ミラクリン成分の活性をも失活させる問題もある。そしてこれら不純物質は水に可溶性のものと考えられるため、近年の抽出法ではあらかじめ除去する目的で、水洗浄前処理を行なった後、ミラクリンをNaCl中性溶液により抽出している。

10 以上のように、これまでのミラクリン抽出方法では不純物がミラクリンに強く結合した複合体により着色及び活性の低下や、過度にpHを低下させる種々酸性物質による活性の低下、そしてこれらを防ぐためにはミラクリンとの複合体を形成する不純物質の除去をするのに、水洗浄前処理を行なわねばならず多大な時間を要するという問題があり、より効率的に、活性を低下させることなく、着色のない安定性に優れたミラクリンの製造方法が求められていた。また、
15 飲食品や医薬品への利用上の面から、そしてまた長期保存や移動運送の面からも、高純度の活性粉末可能なミラクリンを工業的に大量生産し得る方法の開発も当業界において強く求められていた。

20 発明の開示

本発明者らは、上記問題点に鑑み、水洗浄等の前処理を必要とせずに、清浄で活性の安定化したミラクリンの製造をより効率的に行なうことを目的とし、抽出過程におけるミラクルフルーツ中のミラクリンと強固な複合体を形成し易い不純物質に着目し、種々検討を重ねた結果、pH 3.5～5.5の範囲にある緩衝水溶液にNaClを
25 添加した、酸性緩衝塩水溶液を用いた抽出処理を行なうことで、ミラクルフルーツ中に含まれる不純物を除去するための、水洗浄等の

前処理を一切必要とせずに、また、果肉中の種々酸性物質による過度なpH低下を防止できるので、ミラクリン活性の失活も無く、着色の極めて少ないミラクリンの抽出を行なうことができ、しかも清浄で安定性に優れたミラクリンが得られることを見出し本発明をす
5 るに至った。

さらに詳しくは、ミラクルフルーツの新鮮果肉を液体N₂等で凍結し、10～100 mmHgの減圧下で乾燥させる。この凍結乾燥果肉を粉碎し、0～5℃の温度範囲の条件下で、pH 3.5～5.5の範囲にある濃度0.5 M以下の緩衝水溶液に、0.4～0.5 MになるようにNaClを添加した酸性緩衝塩水溶液を、ミラクルフルーツ凍結乾燥果肉1 gに対し5～50 mlの範囲で加え、超音波等でホモジナイズする。これを遠心分離した後、上澄み液を採取し抽出液とする。この抽出処理は2回又は2回以上繰り返すことが好ましい。抽出処理に用いる酸性緩衝塩水溶液としては、pH 3.5～5.5
10 の範囲を維持しえる濃度0.1～0.2 Mの緩衝水溶液に、0.4～0.5 MになるようにNaClを添加したものが好ましく、濃度0.1 Mの緩衝水溶液に、0.5 MになるようにNaClを添加したものがより好ましい。当該条件を満たすものであれば特に制限はしないが、例えばクエン酸1ナトリウム-クエン酸2ナトリウム溶液(0.1
15 M)、酢酸-酢酸ナトリウム溶液(0.1 M)、フタル酸1カリウム溶液(0.1 M)を用いpHを調整した後、NaClを0.5 Mになるように添加して用いる。

抽出対象としてのミラクリン含有物はミラクルフルーツの凍結乾燥果肉が好適に用いられるが、新鮮果肉であっても良い。

25 上記方法によって得られた抽出液にはNaClを含んでいるため、透析、限外ろ過(逆浸透法、イオン交換膜電気透析法等を含む)、ゲルろ過等により脱塩した後、これを凍結乾燥等することにより着色

- の極めて少ない白色のミラクリン粗製粉末が得られる。このミラクリン粗製粉末は吸湿を防ぐためシリカゲル等の吸湿剤で密封処理、又は窒素ガス封入等を施す事で3ヶ月以上甘味誘導活性を安定的に維持し、充分実用に供することができる。さらに脱塩後のミラクリン抽出液は種々の沈殿分離法、すなわち硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、リン酸カリウム等の塩析、等電点沈殿法、水溶性ポリマーであるポリエチレングリコール、デキストラン等による共沈等によって純度を上げることもでき、あるいは、各種クロマトグラフィー、例えばイオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、水素結合クロマトグラフィー、クロマトフォーカシングクロマトグラフィー等の利用や、さらには電気泳動、分子量分画に基づいた膜分離、アフィニティー担体やイオン交換担体を結合させたメンブレンリアクター等によっても精製をすることが可能である。
- 15 本発明の方法によって得られるミラクリン抽出液は着色が極めて少なく、上記種々の精製法を利用されれば容易に純度99%以上のミラクリンを獲得することができる。

- ミラクリン抽出液もしくは、これより得られるミラクリン粉末の着色要因としては、ミラクルフルーツ果肉中のミラクリンと強固な複合体を形成し易い不純物質によること、さらにこれらは、複合体を形成した後は薄茶乃至は褐色の着色不純物質となり、ミラクリンの甘味誘導活性の低下をも招く。そして一度形成されたミラクリンとの複合体から不純物質を除去することは著しく困難である。又ミラクリンとの複合体を形成し易い不純物質としては、フラボノイド色素や酸性物質もしくはこれらの複合体とも考えられているが、未だ、その物質について解明はされていない。又さらに、過度にpHを低下させる種々の酸性物質もミラクリンの甘味誘導活性の低下を
- 20
- 25

招く。

しかし、これらミラクリンと複合体を形成し易い不純物質の影響や種々の酸性物質の影響は、水洗浄前処理することなく、本発明による酸性緩衝塩水溶液を用いた抽出を行なうことで容易に解決することができた。

即ち、着色要因となるミラクリンと複合体を形成し易い不純物質は、酸性緩衝塩水溶液を用いた酸性条件下では、反応基が解離しないか、解離しにくくなることによって、その反応性が著しく低下もしくは不活化してミラクリンとの結合が抑制され、その結果、透明度の高いミラクリン抽出液が得られる。一方、ミラクリン活性に悪影響を及ぼす抽出液のpH低下の問題は、緩衝水溶液の作用により、果肉中の種々酸性物質による抽出液の過度なpH低下がなくなるため、抽出液中におけるミラクリン成分の活性低下も防げる。本発明は、ミラクリンとの複合体を形成し易い不純物質の影響を抑え、かつ好適な抽出pHを維持しうるため、水洗浄をせずとも着色の極めて少ない、甘味誘導活性の安定な優れたミラクリン粉末の採取を容易に行ない得るものである。

発明を実施するための最良の形態

次に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが要旨を越えない限りこれに限定されるものではない。また比較のため本発明のpH範囲外のものについても同時に評価を行なった。

実施例 1

ミラクルフルーツ(Richadella dulcifica)の果肉の凍結乾燥物 1 g に対し、約 0℃(氷水中)の温度条件下で表 1 に示す各種 pH に調製した緩衝塩水溶液(溶液中 0.5 M の NaCl を含む) 15 ml を加え、超音波(20 kHz)で 30 秒間、4 回繰り返しホモジナイズした

後、10000 rpmで45分間遠心分離する抽出処理を行なった。
 遠心分離後、上澄み液を採取しこれを抽出液とした。さらに残渣に
 対し同様の抽出処理を繰り返し、2回目の上澄み液を採取した。各
 種pHの緩衝塩水溶液ごとによる抽出処理で得た2回分の抽出液を
 5 合わせ、ミラクリン抽出液とした。

表1 各種pHの緩衝塩水溶液の調製

番 号	p H	濃 度 (M)	緩衝液の種類 (各溶液中には0.5 M濃度の NaClを含む)
1 (比 較)	3.1	0.1	クエン酸－クエン酸1ナトリウム
2 (実施例)	3.5	0.1	フタル酸1カリウム (1 N塩酸で調整)
3 (実施例)	4.5	0.1	酢酸－酢酸ナトリウム
4 (実施例)	5.1	0.1	酢酸－酢酸ナトリウム
5 (実施例)	5.5	0.1	クエン酸1ナトリウム－クエン酸 2ナトリウム
6 (比 較)	6.5	0.1	炭酸水素ナトリウム (1 N塩酸で調整)
7 (比 較)	7.5	0.1	リン酸1ナトリウム－リン酸2ナ トリウム
8 (比 較)	8.3	0.1	グリシルグリシン (1 N水酸化ナトリウムで調整)
9 (比 較)	9.2	0.1	ホウ酸－ホウ酸ナトリウム
10 (比 較)	10.1	0.1	炭酸1ナトリウム－炭酸2ナトリ ウム

ここで各種 pH の緩衝塩水溶液（溶液中 0.5 M の NaCl を含む）の調製法を下記に示す。なお、下記に使用した試薬は、和光純薬社製ですべて特級を使用した。

(1) pH 3.1 緩衝塩水溶液の調製

- 5 0.1 M クエン酸水溶液と 0.1 M クエン酸 1 ナトリウム水溶液を pH メーターにより pH を確認しながら pH が 3.1 になるまで両液を混合する。pH 3.1 になったら、この溶液中の NaCl 濃度が 0.5 M になるように NaCl を加え調製する。

(2) pH 3.5 緩衝塩水溶液の調製

- 10 0.1 M フタル酸 1 カリウムに pH メーターにより pH を確認しながら pH が 3.5 になるまで 1 N の HCl 水溶液を加える。pH が 3.5 になったら、この溶液中の NaCl 濃度が 0.5 M になるように NaCl を加え調製する。

(3) pH 4.5 緩衝塩水溶液の調製

- 15 0.1 M 酢酸水溶液と 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液を pH メーターにより pH を確認しながら pH が 4.5 になるまで両液を混合する。pH が 4.5 になったら、この溶液中の NaCl 濃度が 0.5 M になるように NaCl を加え調製する。

(4) pH 5.1 緩衝塩水溶液の調製

- 20 0.1 M 酢酸水溶液と 0.1 M 酢酸ナトリウム水溶液を pH メーターにより pH を確認しながら pH が 5.1 になるまで両液を混合する。pH が 5.1 になったら、この溶液中の NaCl 濃度が 0.5 M になるように NaCl を加え調製する。

(5) pH 5.5 緩衝塩水溶液の調製

- 25 0.1 M クエン酸 1 ナトリウム水溶液と 0.1 M クエン酸 2 ナトリウム水溶液を pH メーターにより pH を確認しながら pH が 5.5 になるまで両液を混合する。pH が 5.5 になったら、この溶液中

のNaCl濃度が0.5 MになるようにNaClを加え調製する。

(6) pH 6.5 緩衝塩水溶液の調製

0.1 M炭酸水素ナトリウム水溶液にpHメーターによりpHを確認しながらpHが6.5になるまで1 NのHCl水溶液を加える。
5 pHが6.5になったら、この溶液中のNaCl濃度が0.5 MになるようにNaClを加え調製する。

(7) pH 7.5 緩衝塩水溶液の調製

0.1 Mリン酸1ナトリウム水溶液と0.1 Mリン酸2ナトリウム水溶液をpHメーターによりpHを確認しながらpHが7.5になるまで両液を混合する。pHが7.5になったら、この溶液中のNaCl濃度が0.5 MになるようにNaClを加え調製する。
10

(8) pH 8.3 緩衝塩水溶液の調製

0.1 Mグリシルグリシン水溶液(13.2 gを純水1000 mlで調製)にpHメーターによりpHを確認しながらpHが8.3になるまで1 NのNaOH水溶液を加える。pHが8.3になったら、この溶液中のNaCl濃度が0.5 MになるようにNaClを加え調製する。
15

(9) pH 9.2 緩衝塩水溶液の調製

0.1 Mホウ酸水溶液と0.1 Mホウ酸ナトリウム水溶液をpHメーターによりpHを確認しながらpHが9.2になるまで両液を混合する。pHが9.2になったら、この溶液中のNaCl濃度が0.5 MになるようにNaClを加え調製する。
20

(10) pH 10.1 緩衝塩水溶液の調製

0.1 M炭酸1ナトリウム水溶液と0.1 M炭酸2ナトリウム水溶液をpHメーターによりpHを確認しながらpHが10.1になるまで両液を混合する。pHが10.1になったら、この溶液中のNaCl濃度が0.5 MになるようにNaClを加え調製する。
25

得られた各種pHの緩衝塩水溶液によるミラクリン抽出液5 mlを、

純水で平衡化してある脱塩用ゲルろ過クロマトグラフィー（ファルマシア社製）により脱塩し、7 mlの脱塩液を得、これをミラクリン抽出脱塩液とした。

5 各種 pH のミラクリン抽出脱塩液について J I S Z 8 7 2 1 に規定する色度票を用い着色度を、さらには甘味誘導活性の官能試験を下記の手順に従って評価し、得られた結果を表 2 に示した。尚、表中の着色度に記載される「－」は無色透明であったことを示す。

表 2 から、各種 pH の緩衝塩水溶液の内、本願の酸性緩衝塩水溶液によるものが着色度もなく甘味誘導活性も高いことが判る。

10 着色度試験手順

直射日光をさけた自然光下で、内径 19 mm、外径 21 mm の試験管にミラクリン抽出脱塩液 3.5 ml を入れ、垂直に立てた。横からみた抽出脱塩液について、色相、明度、彩度を表示する J I S Z 8 7 2 1 色度票と隣接させて比較して着色度を測定した。

15 甘味誘導活性評価手順

① 0.1 M クエン酸溶液を 2 ～ 3 ml、口に含み、酸味を感じる事を確認する。

② 吐き出して水で口をすすぐ。

③ ミラクリン抽出脱塩液 2.5 ml を口に含む。

20 ④ 1 分間、舌の上でころがすようにして舌に十分吸着させる。

⑤ 吐き出して水で口をすすぐ。

⑥ 0.1 M クエン酸溶液を 2 ～ 3 ml、口に含む。この時の甘さを記憶しておく。

25 ⑦ 標準甘味溶液 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 M ショ糖溶液) 2 ～ 3 ml を口に含み 0.1 M クエン酸を味わったときとの甘味を比較し同等の甘味をもつショ糖溶液の濃度を決定し、その濃度を甘味誘導活性とする。

表 2 抽出脱塩液の着色度

番 号	p H	着色度	甘味誘導活性
1 (比較)	3 . 1	—	0 . 2
2 (実施例)	3 . 5	—	0 . 3
3 (実施例)	4 . 5	—	0 . 3
4 (実施例)	5 . 1	—	0 . 3
5 (実施例)	5 . 5	—	0 . 3
6 (比較)	6 . 5	5 Y R 8 / 2	0 . 2
7 (比較)	7 . 5	5 Y 8 / 3	0 . 1
8 (比較)	8 . 3	2 . 5 Y 7 / 6	0 . 1
9 (比較)	9 . 2	2 . 5 Y 7 / 8	0 . 1
10 (比較)	1 0 . 1	1 0 Y R 6 / 8	0 . 1

着色度評価基準 (J I S Z 8 7 2 1)

15 例 : (1 0 Y R 6 / 8)

↓ ↓ ↓

色相 明度 彩度を表わす。

色相 : 4 段階 (2.5, 5, 7.5, 10)

Y は Yellow、R は Red の略

20 明度 : 8 段階 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9)

暗い ← → 明るい

彩度 : 色相が 5, 10 の時、

10 段階 (N, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14)

色相が 2.5, 7.5 の時、

25 9 段階 (N, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14)

明るい (薄い) ← → 暗い (濃い)

次に、各種 pH のミラクリン抽出脱塩液 3.5 ml を 5 ml のバイアルビンに移し、これらを凍結乾燥してミラクリン粗製粉末を得、これらの着色度を同様に J I S Z 8 7 2 1 色度票とミラクリン粗製粉末の入ったバイアルビンを隣接し比較して着色度を測定した。その結果を表 3 に示した。

本発明の酸性緩衝塩水溶液によるものからは、着色のない白色のミラクリン粗製粉末が得られた。

表 3 ミラクリン抽出脱塩液から得られた凍結乾燥粗製粉末の着色度

番 号	p H	着色度
1 (比 較)	3. 1	2. 5 R 9 / N
2 (実施例)	3. 5	2. 5 R 9 / N
3 (実施例)	4. 5	2. 5 R 9 / N
4 (実施例)	5. 1	2. 5 R 9 / N
5 (実施例)	5. 5	2. 5 R 9 / N
6 (比 較)	6. 5	2. 5 Y 7 / 4
7 (比 較)	7. 5	5 Y R 7 / 3
8 (比 較)	8. 3	7. 5 Y 7 / 4
9 (比 較)	9. 2	7. 5 Y 7 / 4
10 (比 較)	10. 1	5 Y 5 / 4

各種 pH によるミラクリン抽出液それぞれについて、抗ミラクリン Ig G (抗体: イムノグロブリン) に酵素 (POD: パーオキシターゼ) を結合し標識化した。サンドイッチ法 (P. K. Nakane, and A. Kawaoi, (1974) Peroxidase-Labeled antibody: a new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem., 22, 1084-1091) によりミラクリンの定量を行ない、比較評価し、その結果を表 4 に示した。

本発明の酸性緩衝塩水溶液からのものは、他の酸性緩衝塩水溶液と比べミラクリン含量が高い。このことから本発明の酸性緩衝塩水溶液を用いれば、不純物質が少なくミラクリンを安定化して抽出できることは明らかである。

表 4 抽出液中のミラクリン含量

番 号	p H	ミラクリン含量 ($\mu g / ml$)
1 (比 較)	3 . 1	1 6 0
2 (実施例)	3 . 5	2 5 7
3 (実施例)	4 . 5	2 0 3
4 (実施例)	5 . 1	2 0 2
5 (実施例)	5 . 5	2 4 2
6 (比 較)	6 . 5	1 7 3
7 (比 較)	7 . 5	1 5 0
8 (比 較)	8 . 3	1 5 2
9 (比 較)	9 . 2	1 5 6
10 (比 較)	1 0 . 1	7 4

ここで、ミラクリンの定量は次のようにして行なった。

ミラクリン定量操作

9 6 穴のマイクロプレートのウエル（穴）各々に、100 μ l の抗ミラクリン I g G を入れ、4℃で一晩放置し、抗ミラクリン I g G をウエル内壁に結合させる。放置後ウエル内壁に結合させた抗ミラクリン I g G を 0.18% のリン酸カリウム水溶液（pH 7.5）で洗浄する。ウエル内の残液を除去した後、0.18% リン酸カリウム水溶液（pH 7.5）に溶解した 1% BSA（牛血清アルブミン：CALBIOCEM 社製）溶液 150 μ l を、各ウエルに加え 2 時間室温で放置する。ウエル内の 1% BSA 溶液を除去した後、既知濃度のミラクリン溶液および得られた各種 pH によるミラクリン抽出液を 10000 倍に希釈したもの 100 μ l を、ウエル内壁に結合している抗ミラクリン I g G に加え、2 時間室温で放置する。再度 0.18% のリン酸カリウム水溶液（pH 7.5）で洗浄し、ウエル内の残液を除去した後、標識化 I g G を 100 μ l 加え、2 時間室温で放置する。次に 0.18% のリン酸カリウム水溶液（pH 7.5）で洗浄し、ウエル内の残液を除去した後、各ウエルにパーオキシターゼ用発色キット（住友ベークライト社製）の発色液を加えて発色させた。3 分後、同キットの停止液を加えて反応を止めた後、イムノリーダーで吸光度（405 nm）を測定し、上記既知濃度のミラクリン溶液 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, ng（ナノグラム）/ml の測定値から作成した検量線を基に抽出液中のミラクリン含量を測定した。

又、上記で使用した抗ミラクリン I g G 及び標識化 I g G の作成法を下記に示す。

抗ミラクリン I g G の作成

純度 99.9% 以上の精製ミラクリン 250 μ g を同量の完全フロ

イントアジュバントで乳化した後、うさぎ（体重：3～3.5 Kg）に注射し10日後、20日後にさらに250 μ gの不完全フロイントアジュバントを、うさぎに注射した。最後の注射から1週間後採血し、抗ミラクリン血清を得た。

- 5 この血清7 mlを0.05 M トリス塩酸塩（pH 8.5, 0.15 M NaCl）で平衡化したプロテインA（生化学工業社製）5 mlに添加し、低温室（4℃～10℃）で2～3時間スターラーでゆっくり攪拌して抗ミラクリン Ig Gを吸着させた。上述の平衡化したプロ
- 10 テインAに抗ミラクリン Ig Gを吸着させたものをカラムに充填した後、0.05 M 酢酸ナトリウム（pH 4.0, 0.15 M NaCl）でIg Gを溶出することにより精製抗ミラクリン Ig G、約25 mgを得た。

標識化 Ig G の作成

- 4 mgのPOD（パーオキシターゼ：ベーリンガー社製）を1 mlの
- 15 純水に溶解した後、0.1 M 過ヨウ素酸ナトリウム0.2 mlを加え室温で20分間放置し、透析チューブに入れ、1 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.4）で一晩透析した。

- 抗ミラクリン Ig GにPODを結合させるため、透析終了後のPODに0.2 M 炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.5）を加えpH
- 20 9前後に調整した。このPODに8 mgの抗ミラクリン Ig Gを含む1 mlの0.01 M 炭酸ナトリウム緩衝液（pH 9.5）を加え室温で2時間振盪した。さらに、PODが結合した抗ミラクリン Ig Gを分離するため、1 mlの純水に溶解した4 mgの水素化ホウ素ナトリウムを0.1 ml加え、4℃で2時間放置した後、ゲルろ過クロマト
- 25 グラフィー（Sephacryl s-200 カラム、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.8で平衡化）にかけ2 mlずつフラクションを採りだし、フラクションごとの280 nm（タンパクの吸収を表わす）、

4 0 3 nm (P O D の吸収、正確には P O D の中の鉄の吸収である。) 及び 4 0 5 nm (P O D 活性の吸収を表わす) における吸収を測定した。これら 3 つの吸収ピークをもつフラクションは、抗ミラクリン I g G と活性を持つ P O D とが結合しているフラクションであり、
5 標識化された I g G を含んだものである。3 つの吸収ピークを持つフラクションを集め、そしてさらに、標識化された I g G を安定化するため、このフラクション中の B S A (粉末牛血清アルブミン; 和光純薬社製、免疫測定用) 濃度が 1 mg/ml となるように B S A を加える。これを標識化 I g G とした。

10

産業上の利用可能性

本発明は酸性緩衝塩水溶液を用いた抽出を行なうことにより、着色や甘味誘導活性低下の要因となるミラクリンと複合体を形成し易い不純物質の、反応性の抑制を図れる効果を有すると共に、ミラク
15 ルフルーツ中の種々酸性物質による過度な p H の低下もないので、ミラクリン成分の活性低下をも防げる。さらに抽出前処理としての不純物質の除去処理をする必要もなくなり、これまでの方法に比べ効率的に甘味誘導活性の安定した、着色の極めて少ないミラクリンを得ることができ、効率的な工業生産に寄与するものである。

20 本発明によれば、着色の極めて少ない甘味誘導活性の安定したミラクリンを得ることができるため、純度の高い精製ミラクリンも容易に工業生産でき、飲食品や医薬品の製造上きわめて有利な貢献をなすものである。

25

請 求 の 範 囲

1. ミラクリン含有原料から酸性緩衝塩水溶液によって、抽出することを特徴とするミラクリンの製造方法。
2. 請求の範囲第1項に記載の酸性緩衝塩水溶液がpH 3.5～5.5の範囲であることを特徴とするミラクリンの製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP92/01584

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ A23L1/22, C07K3/02, 15/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ A23L1/22-1/222, C07K3/02, 15/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 63-185349 (Mitajiri Kagaku Kogyo K.K.), July 30, 1988 (30. 07. 88), (Family: none)	1-2
A	JP, B2, 46-507 (Unilever N.V.), January 8, 1971 (08. 01. 71), NL, A, 6911954 & GB, A, 1260020 & DE, B, 1940083 & US, 3682880 & FR, A, 2060446	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

February 22, 1993 (22. 02. 93)

Date of mailing of the international search report

March 16, 1993 (16. 03. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A23L1/22, C07K3/02, 15/14

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ A23L1/22-1/222, C07K3/02, 15/14

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 63-185349 (三田尻化学工業株式会社) 30. 7月. 1988 (30. 07. 1988) (ファミリーなし)	1-2
A	JP, B2, 46-507 (ユニリーバー・ナムローゼ・ベ ンノートシャープ) 8. 1月. 1971 (08. 01. 71) NL, A, 6911954 & GB, A, 1260020 & DE, B, 1940083 & US, 3682880 & FR, A, 2060446	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 02. 93

国際調査報告の発送日

16.03.93

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4 B 8 1 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線

3449